

Ruolo della fauna selvatica nella diffusione e mantenimento dell'antibiotico resistenza– PRC2016020

Tranquillo Vito (Responsabile Scientifico) * ¹

¹ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna- Sezione di Bergamo (tel. 0354236036)*

* *corresponding author: vito.tranquillo@izsler.it*

Indice

Elenco collaboratori e contributi	2
Razionale	3
Cronogramma	4
Relazione	5
Metodi	5
Campionamento	5
Isolamento Enterobacteriacee	5
Identificazione di genere e specie	5
Profilo fenotipico di antibiotico-resistenza	5
Archiviazione ceppi	6
Analisi metagenomiche	6
Risultati	7
Campioni di feci	7
Ceppi isolati	7
Profilo fenotipico di antibiotico-resistenza	8
Multiple Antimicrobial Resistance Index	8
Bibliografia	10

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute, Dipartimento della Sanità Pubblica Veterinaria, della Sicurezza alimentare e degli Organi Collegiali per la Tutela della Salute.

UNITA'OPERATIVA COORDINATRICE: U.O.1-Sezione diagnostica di Bergamo (responsabile scientifico Dr. Tranquillo Vito)

Data Inizio Progetto: 15/12/2017

Data Fine Progetto: 14/12/2019

Data Relazione Intermedia: 12/02/2019

Elenco collaboratori e contributi

U.O.1 (sez. di Bergamo)- Dr. Tranquillo Vito (Responsabile Scientifico): In questa prima parte del progetto l'U.O. ha coordinato le attività con le altre U.O., sviluppato e gestito gli strumenti per la raccolta dei dati e la diffusione delle informazioni tra U.O. mediante l'attivazione di un applicazione web (<https://myappshiny.shinyapps.io/PRC2106020/>). A febbraio del 2018 è stata attivata la borsa di studio con l'inserimento del Dr. Alfredo Facchi, che ha condotto le attività di laboratorio di isolamento dei ceppi, identificazione, profilo di antibiotico-resistenza, archiviazione dei ceppi e inserimento dei dati nel database.

U.O.2 (Analisi del Rischio - Parma)- Dr. Pongolini Stefano: Nell'ultima fase di questo primo anno di progetto, l'U.O.2 in collaborazione con l'U.O.1 ha definito le attività di analisi genomica che impegneranno l'U.O. 2 nel secondo anno del progetto. In considerazione delle risorse finanziarie accordate al progetto è stato definito che le analisi metagenomiche saranno condotte su pool omogenei di ceppi.

U.O.3 (Sez. di Sondrio)- Dr.ssa Bertoletti Irene: L'U.O.3 ha proceduto con la raccolta a partire dal territorio della provincia di SO e LC, dei campioni di feci della fauna selvatica secondo le indicazioni indicate nel progetto e alle attività di processazione dei campioni di feci, isolamento dei ceppi di enterobatteriacee, profilo di antibiotico-resistenza, archiviazione dei ceppi e inserimento dei dati nel database.

U.O.4 (sez. di Brescia)- Dr. Alborali Loris: Alla data di stesura del relazione intermedia, l'U.O. 4 non ha fornito nessun contributo rispetto a quanto concordato durante la formulazione del progetto.

U.O.5 (sez. di Binago)- Dr. Sala Giovanni: L'U.O. 5 ha contribuito mediante l'attività di recupero dei campioni di feci e invio all'U.O.1 come stabilito nel progetto.

U.O.6 (sez. di Pavia)- Dr. Massimo Fabbi: L'U.O. 6 ha contribuito mediante l'attività di recupero dei campioni di feci e invio all'U.O.1 come stabilito nel progetto.

Razionale

L'Antibiotico-Resistenza (AR) è una grave minaccia per la salute umana, in quanto compromette la capacità di trattare le infezioni. La resistenza agli antibiotici si sviluppa attraverso complessi meccanismi come la mutazione sotto la pressione selettiva derivante dall'uso/abuso di antibiotici in medicina umana e veterinaria, o frequentemente da acquisizione di geni che si sono evoluti nel corso del tempo nei batteri nell'ambiente. Il serbatoio di geni di resistenza nell'ambiente è un mix di resistenza naturale e quella presente nelle deiezioni di animali e uomini, a cui si possono aggiungere gli effetti selettivi di inquinanti, che possono co-selezionare elementi genetici mobili che trasportano più geni di resistenza. I dati disponibili mostrano che numerose specie di fauna selvatica possono veicolare batteri resistenti agli antimicrobici (ARB) o geni di resistenza agli antibiotici (ARG), in una vasta gamma di habitat. Anche se l'AR è stata riportata nella fauna selvatica, l'esposizione diretta agli antimicrobici è da considerarsi un evento raro, ciò indica che la condivisione di habitat comuni, le fonti d'acqua e l'inquinamento ambientale potrebbero comportare il trasferimento di ARB e ARG alla fauna selvatica e viceversa. Inoltre gli ARB si trovano naturalmente nel suolo, in assenza di farmaci antimicrobici di origine antropica dovuta alla produzione naturale di molecole antibiotiche da parte di alcuni batteri e funghi. Le principali misure attualmente applicate per ridurre il fenomeno dell'AR si basano sulla riduzione dell'uso di antibiotici sia nell'uomo che negli animali domestici (d'allevamento e da compagnia). La fauna selvatica come serbatoio di ARB e ARG potrebbe limitare l'efficacia di queste strategie atte a ridurre o prevenire l'AR nell'uomo e animali. Tutte queste evidenze pongono la questione del ruolo della fauna selvatica in AMRB e ARG dinamiche a livello di interfaccia tra le

popolazioni umane, animali domestici e l'ambiente. Il presente progetto di ricerca ha come obiettivo quello di raccogliere evidenze in grado di delineare il ruolo della fauna selvatica nella diffusione e mantenimento sia di ARB che ARG, attraverso lo studio della prevalenza delle specie batteriche antibiotico-resistenti (AMRB) isolate da campioni di feci di animali selvatici attraverso l'utilizzo di metodi classici di microbiologia e caratterizzazione dei loro geni di antibiotico-resistenza e lo studio diretto dei geni di resistenza individuati nelle feci di animali selvatici e nel loro ambiente attraverso metodi molecolari (PCR) .

Questo progetto permetterà di ottenere una stima attendibile della prevalenza di ceppi AR di diversi microrganismi bersaglio presenti nelle feci di differenti specie di fauna selvatica in diversi habitat delle alpi lombarde, in una vasta area naturale caratterizzata da un vario grado di antropizzazione. I geni di resistenza che caratterizzeranno i diversi ceppi batterici isolati saranno confrontati con il database dei geni di resistenza isolati da uomo e animali, al fine di studiare le possibili dinamiche di trasmissione di AR nella fauna selvatica. Consideriamo di particolare interesse i risultati della determinazione diretta di ARG in campioni fecali e l'ambiente, sia perchè questi metodi sono più rapidi sia perchè permettono di esplorare il patrimonio genetico dei batteri non coltivabili che possono essere portatori di fattori di resistenza trasmissibili.

Cronogramma

Alla data di compilazione della presente relazione è terminata l'attività di campionamento delle feci da parte delle diverse U.O. impegnate nel progetto. L'U.O.1 (Sez. di Bergamo) e U.O.3 (Sez. di Sondrio) concluderanno l'attività di isolamento, dai campioni di feci non ancora processati, dei ceppi di Enterobacteriacee, la loro identificazione biochimica, l'esecuzione degli antibiogrammi per la definizione del profilo fenotipico di resistenza e l'archiviazione in brodo di mantenimento con glicerolo in congelatore.

I prossimi mesi saranno dedicati all'esecuzione delle analisi metagenomiche su selezionati ceppi di *Escherichia coli* e altri generi di Enterobacteriaceae e in particolar modo ceppi rilevanti come patogeni portatori di geni di resistenza in ambito di medicina umana.

Relazione

Metodi

Campionamento

Si è proceduto ad un campionamento non probabilistico di convenienza utilizzando sia i campioni raccolti durante le attività di sorveglianza del piano regionale fauna selvatica della Lombardia (cinghiali, ruminanti selvatici, lagomorfi, volatili) , sia i campioni provenienti da attività di sorveglianza del piano CWD (cervi e caprioli) e del piano West Nile Disease (Cornacchie, Gasse). I campioni di feci raccolti dall'intestino degli animali sono stati stoccati a temperatura di congelamento in attesa di essere processati.

Isolamento Enterobacteriacee

Per l'isolamento delle Enterobacteriaceae dalle feci si è provveduto ad effettuare semina diretta dei campioni di feci scongelati su terreno differenziale McConkey Agar.

Identificazione di genere e specie

L'identificazione di genere e specie delle colonie isolate sul terreno McConkey è stata effettuata attraverso l'utilizzo di gallerie biochimiche (enterotube e api-strep)

Profilo fenotipico di antibiotico-resistenza

Il profilo di antibiotico resistenza è stato ottenuto sottoponendo i singoli ceppi al metodo Muller-Hinton Globuli in Agar utilizzando il seguente profilo di antibiotici: oxacillina, eritromicina, tilmicosina, ampicillina, tetraciclina, ceftiofur, colistina, kanamicina, enrofloxacin, gentamicina; profilo indicato dal centro di referenza per le antibiotico resistenze.

Archiviazione ceppi

I ceppi isolati, identificati e caratterizzati per il profilo di anitibiotico resistenza sono stati quindi conservati in brodo e glicerolo a temperature di congelamento, costituendo una banca di ceppi disponibili per ulteriori analisi.

Analisi metagenomiche

Le analisi metagenomiche saranno effettuate sui seguenti pools di ceppi di *Escherichia coli* costituiti secondo criteri di confrontabilità e rappresentatività di, area di campionamento, specie di provenienza, e in base alla disponibilità numerica; un ulteriore pool è costituito da ceppi di *Klebsiella pneumoniae* di particolare interesse come patogeno nosocomiale:

- Pool 1: 50 *E.coli* da CERVIDI "PREALPI BG";
- Pool 2: 50 *E.coli* da CERVIDI "VAL BREMBANA";
- Pool 3: 31 *E.coli* "VAL SERIANA" + "VAL BORLEZZA";
- Pool 4: 50 *E.coli* da CERVIDI "Sondrio media valle";
- Pool 5: 35 *E.coli* da CERVIDI "Sondrio alta valle";
- Pool 6: 50 *E.coli* da CINGHIALE;
- Pool 7: 50 *E.coli* da CORVIDI;
- Pool 8: 50 *E.coli* da sCAPRINAE;
- Pool 9: 48 *E.coli* da RAPACI;
- Pool 10: 20 *Klebsiella pneumoniae*

Risultati

Campioni di feci

Le attività di campionamento hanno permesso di raccogliere complessivamente 729 campioni di feci. In fig 1 è riportata la distribuzione dei campioni per U.O. e per raggruppamento di specie.

	Specieagg											Totals
UO		CERVIDI	CORVIDI	sCAPRINAE	CINGHIALE	RAPACI	CARNIVORI	UCCELLI ACQUATICI	ALTRI VOLATILI	LEPRE	null	
U.O.1		169	53	50	4	53		12	4	1		346
U.O.2		89	15	13	16	15	13	1				162
U.O.5		25	5	36	38		11	2		1		118
U.O.6		1	77		20				2	2	1	103
Totals		284	150	99	78	68	24	15	6	4	1	729

Figura 1: Numero di campioni di feci raccolte dalle diverse U.O.

Ceppi isolati

Complessivamente sono stati isolati 924 ceppi di Enterobacteriaceae. In fig.2 è riportata la distribuzione dei ceppi per i differenti generi e per specie di provenienza.

	identificazione																	Totals
Specieagg		E.coli	Klebsiella	Enterobacter	Serratia	Pantoea	Hafnia	Proteus	Acinetobacter	Non identificabile	Citrobacter	Yersinia	Cronobacter	Salmonella	Providencia	Shigella	Pseudomonas	
CERVIDI		209	12	11	15	21	13	2	4	6	1	4	5	3		1		363
CORVIDI		91	35	38	17	2	16	6	5	1	9			2			1	224
sCAPRINAE		76	8	1	6	13	4		2	4	1	2	1			2		120
CINGHIALE		91		1	1	2			1		1	1						98
RAPACI		52	4	2			2	6	1		1							68
CARNIVORI		20			1	1					1							23
UCCELLI ACQUATICI		15		2														17
ALTRI VOLATILI		5	1															6
LEPRE		2	1	1			1											5
null		1														1		2
Totals		610	61	56	40	39	36	14	13	13	12	7	6	5	4	1	1	924

Figura 2: Numero di ceppi isolati per Genere

Profilo fenotipico di antibiotico-resistenza

Tutti i ceppi isolati sono stati testati per il profilo di antibiotico-resistenza. In figura 3 è riportato per ogni antibiotico la % di ceppi isolati risultati resistenti.

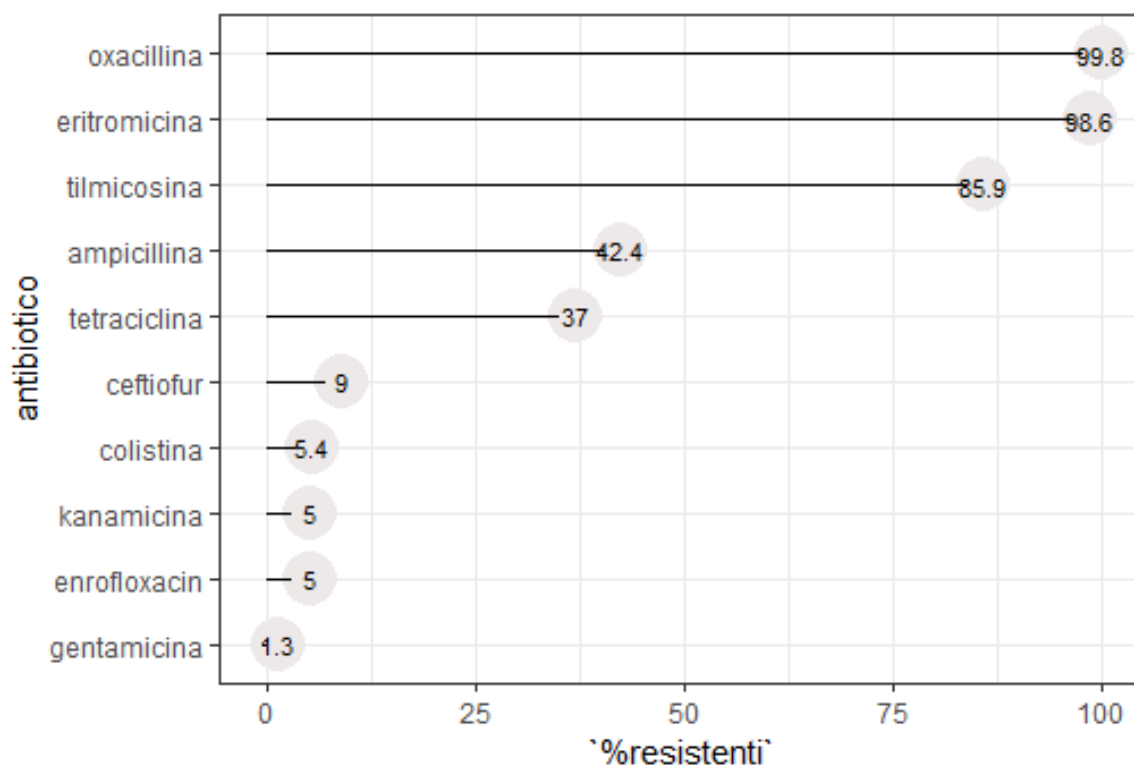


Figura 3: ceppi resistenti per antibiotico

Una più dettagliata visualizzazione dei profili di resistenza per ceppo e per specie di fauna selvatica di provenienza dei ceppi è riportata nella sottosezione “Antibiotico-Resistenza” dei risultati al sito (<https://myappshiny.shinyapps.io/PRC2106020/>).

Multiple Antimicrobial Resistance Index

Questo indice è una misura della pressione selettiva esercitata dagli antimicrobici sulle popolazioni batteriche di una determinata specie o ambiente. Valori >0.20 indicano una pressione selettiva elevata che spiega la resistenza multipla osservata. Sui dati del progetto Il MAR Index viene calcolato per le differenti specie di animali selvatici campionati, condizionalmente all'area di provenienza. Si tratta di

un indice molto utilizzato in letteratura come strumento descrittivo e di confronto. Nella seguente figura è riportato il MAR index per i differenti raggruppamenti di specie indipendentemente dall'area di provenienza degli animali. Una visualizzazione del MAR index per singola area di provenienza è riportato nel sito del progetto, nella sezione risultati -Multiple Antimicrobial Resistance Index.

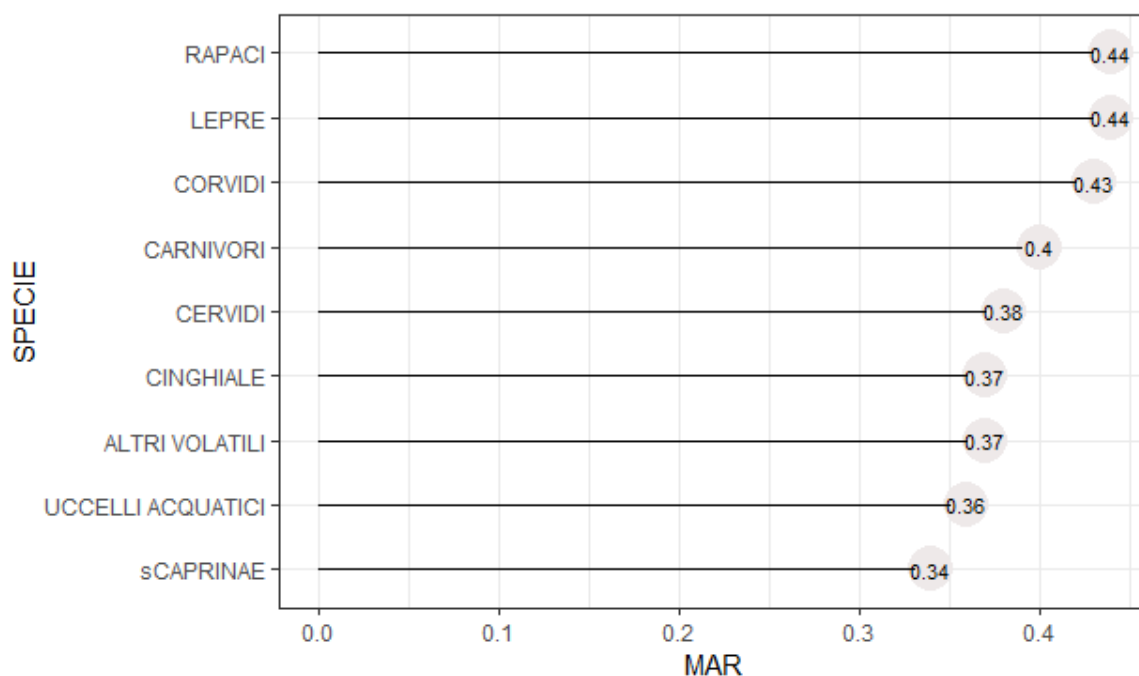


Figura 4: MAR Index per Specie

I risultati fino ad ora raggiunti permettono di verificare che nell'ambito delle diverse specie di fauna selvatica di alcune province del Nord Italia, i ceppi di Enterobacteriaceae isolati mostrano rilevanti e importanti resistenze al pannello di antibiotici utilizzato. Il dato rilevante mostrato dal MAR index suggerisce la diffusione di ceppi multi-resistenti tra specie. Nel proseguo del progetto i dati raccolti sui profili fenotipici di resistenza saranno ulteriormente analizzati per descrivere le relazioni tra resistenza, ceppo, specie e aree di provenienza dei campioni. A queste ulteriori analisi si aggiungeranno anche le valutazioni derivanti dalle indagini metagenomiche su pools di ceppi che saranno effettuate dall'U.O.2.

Bibliografia

- -Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., Handelsman, J. (2010). Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8(4), 251-259.
- -Greig, J., Rajić, A., Young, I., Mascarenhas, M., Waddell, L., LeJeune, J. (2015). A scoping review of the role of wildlife in the transmission of bacterial pathogens and antimicrobial resistance to the food chain. *Zoonoses and Public Health*, 62(4), 269-284.
- - Davies, J., Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 74(3), 417-433
- - Smith, S., Wang, J., Fanning, S., McMahon, B. J. (2014). Antimicrobial resistant bacteria in wild mammals and birds: A coincidence or cause for concern? *Irish Veterinary Journal*, 67(1), 1.
- - Wellington, E. M., Boxall, A. B., Cross, P., Feil, E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M., et al. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(2), 155-165.
- - Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 933-51, table of contents.